

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 1)

(11)特許番号

特許第3017493号

(P3017493)

(45)発行日 平成12年3月6日(2000.3.6)

(24)登録日 平成11年12月24日(1999.12.24)

(51)IntCl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

A 6 1 K 35/74

A 6 1 K 35/74

A

A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/30

Z

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 29/00

1 0 1

37/02

37/02

C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A

請求項の数6(全6頁)

(21)出願番号 特願平11-47532

(22)出願日 平成11年2月25日(1999.2.25)

審査請求日 平成11年4月14日(1999.4.14)

特許法第30条第1項適用申請有り Milchwissenschaft, Vol. 53, No. 8, (1998. 9. 21), p. 443~446に発表

(73)特許権者 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(72)発明者 伊藤 敏敏

仙台市泉区将監2-20-7

(72)発明者 植村 順子

仙台市太白区長町8-6-10 東北大学  
長町宿舎2-210

(72)発明者 狩野 宏

東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳  
業株式会社中央研究所内

(74)代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

審査官 上條 のぶよ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 自己免疫疾患予防組成物

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 自己免疫疾患予防作用を有し、ガラクトースとグルコースを構成糖とし且つリンを含有する多糖類生産性を有する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする自己免疫疾患予防組成物。

【請求項2】 乳酸菌がラクトバチルス・デルブルエッキー・サブスピーシス・ブルガリクス (Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus) OLL 1073 R-1であること、を特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 乳酸菌含有物が、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物、乳酸菌培養液、乳酸菌発酵乳から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1又は2に記載の組成物。

2

【請求項4】 処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物(噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつ)、希釈物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項5】 組成物が飲食品タイプ又は医薬品タイプの組成物であること、を特徴とする請求項1~4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項6】 Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1 (FERM P-17227)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自己免疫疾患予防効果を有する乳酸菌および該乳酸菌を含有する組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】免疫細胞は生体防御において中心的な役割を果たしている。しかし、近年、アレルギーや自己免疫疾患等で見られるように、免疫系における制御の破綻を原因とする疾患が著しく増加している。アレルギーは本来生体にとって無害な抗原に対して生体側の免疫細胞が過剰に反応してしまうために生じる疾病である。自己免疫疾患は免疫細胞が生体自身の組織や成分などに反応するために生じる疾病である。自己免疫疾患はその発症、および慢性化に自己免疫応答が関与しているため、潰瘍性大腸炎や慢性関節リウマチの一部など自己免疫疾患として知られている疾病について、いずれにおいても対症療法はあるが予防法は無論、完治法は未だ確立していない。

【0003】前述のとおり、自己免疫疾患の慢性化には免疫系における制御の破綻が大きく関与しており、特に、Th1型のサイトカインを産生するT細胞が関与している。生体免疫系において、ヘルパーT細胞には、1型ヘルパーT細胞(Th1)と2型ヘルパーT細胞(Th2)とが存在する。これらの内、Th1細胞は、IL-2、IFN- $\gamma$ を産生し、IgG2aの産生を誘導し、遅延型過敏反応を高める。それに対し、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-6、IL-10を産生し、IgE、IgG1の産生を誘導する。生産されたこれらのサイトカインは相互に作用し合って、免疫、アレルギー反応を調節する。健康な生体内ではTh1とTh2の均衡が保たれているが、アレルギーが引き起こされる場合はTh2が優勢であり、逆に、自己免疫疾患ではTh1が優勢となっていることが知られている。

【0004】自己免疫疾患の一種である慢性関節リウマチにおいても、Th1タイプのサイトカインの関与が示唆されており、動物実験モデルにおいてTh1サイトカインの一つであるIFN- $\gamma$ を中和あるいはTh2サイトカインの一種であるIL-4を投与することにより関節炎の抑制、または軽減化が確認されている。しかし、Th1タイプの免疫応答は各種病原菌、および腫瘍の排除において重要な役割を果たすため、過剰なTh2へのシフトはアレルギーの原因となるだけではなく、病原菌やウイルスによる感染、および腫瘍に対する抵抗性の低下へとつながる。また、Th2タイプのサイトカインや免疫抑制剤の投与はその副作用だけではなく、コストの面でも問題があり、長期間の療養を必要とすることが多い自己免疫疾患患者への負担は大きい。そこで慢性関節リウマチの治療および予防には極端なTh2応答へのシフトなどの副作用がなく、なおかつ日常的に摂取できるような薬品または食品の開発が求められている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】前述のような理由から、本発明は慢性関節リウマチ等の予防手段として、安価で日常的に摂取が可能であり、なおかつ安全な、つま

り、Th1応答の過剰な抑制による弊害のない食品、あるいは医薬品の提供を目的としている。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記した問題を解決するためになされたものであり、慢性関節リウマチの動物実験モデル(Collagen-Induced Arthritis; CIA)に対する乳酸菌の抑制効果につき鋭意研究を重ねた結果、乳酸菌のうち、多糖類産生能を有するLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1を見出した。該菌の発酵物をマウスに経口投与することによりCIAの発症が抑制され、なおかつ発症した場合においてもその重篤度は軽減化される、という重要な知見が得られた。また、該菌は慢性関節リウマチの他に、潰瘍性大腸炎など他の炎症性疾患に対する抑制効果を有するものと期待される。Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1の菌学的性質は以下の通りである。

## 【0007】A. 形態的性状

細胞の形：桿菌

運動性：なし

孢子の有無：なし

グラム染色性：陽性

## 【0008】B. 培地上の生育状態

BL寒天培地(栄研化学)平板上で該菌株を塗布し、スチールウール法により37℃、48時間培養して、不透明なラフ型コロニーの形態を示す。

## 【0009】C. 生理学的性状

硝酸塩の還元：陰性

インドール生成：陰性

ゼラチン液化：陰性

カタラーゼ：陰性

酸素に対する態度：通性嫌気性

グルコースよりホモ乳酸発酵によりD(-)乳酸を生成し、ガスを産生しない

BL液体培地で10℃での生育は陰性、45℃での生育は陽性

アルギニン分解性：陰性

リンゴ酸からのガス産生：陰性

各種炭水化物の分解性(陽性+、陰性-)

アラビノース -

キシロース -

ラムノース -

リボース -

グルコース +

マンノース +

フルクトース +

ガラクトース -

シュクロース -

マルトース -

セロビオース -

5

6

ラクトース +  
 トレハロース -  
 メリビオース -  
 ラフィノース -  
 メレチトース -  
 デキストリン -  
 デンブリン -  
 グリコーゲン -  
 イヌリン -  
 マンニトール -  
 ソルビトール -  
 イノシトール -  
 エスクリン -  
 サリシン -

## 【0010】D. 遺伝学的特性

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1をTannockらの方法 (Microbial. Ecol. Health Dis. 8:79-84(1995), Appl. Environ. Microbiol. 62:4608-4613(1996)) に準じて、培養後に菌体をアガロースプラグに固定し、溶菌後、ゲノムDNAを制限酵素 (A 20 p a I) で分解してパルスフィールド電気泳動を行ったところ、図1のバンドパターンを示した。図中、Aはサイズマーカー、Bは*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1を示す。

## 【0011】E. 多糖類生産性

(表1: 糖及びリンの含有量)

	含有量 (%)		モル比	
	全炭水化物	リン	G l c	G a l
NPS	68.1	0.0	1.0	1.3
APS	73.6	0.1	1.0	1.3

【0015】メチル化による分析の結果、NPSは、3Gal及び2Glcのくり返し単位を有する5糖類からなるものであった。その結果を表2に示す。なお、2,3,4,6-Tetra-O-Me-Galを1.0とした。

## 【0016】

(表2: NPSのメチル化分析)

	モル比
2,3,4,6-Tetra-O-Me-Gal	1.0
2,3,6-Tri-O-Me-Gal	0.7
3,4,6-Tri-O-Me-Glc	0.8
2,4,6-Tri-O-Me-Glc	1.3
2,6-Di-O-Me-Gal	0.9

【0017】本菌株は、一般的菌学的性質からみて、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* に属する

\* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1 (以下、本菌株ということもある) は多糖類生産性を有し、ガラクトースとグルコースを構成糖としリンを含有する多糖類を細胞外へ生産するという特徴を有する。

【0012】すなわち、本菌株を10%脱脂粉乳培地で37℃、24時間インキュベートした後の培養物1Lについて、エタノール沈澱、ヌクレアーゼ及びプロティナーゼ処理した後、凍結乾燥し、多糖類58.4mgを得た。この多糖類について、DEAE-TOYOPEARL 650Mを用いるイオン交換樹脂処理を行い、樹脂に吸着しない中性多糖類 (NPS) と樹脂に吸着する酸性多糖類 (APS) の2つのフラクションを、それぞれ、4.26mg/l及び2.18mg/l得た。

【0013】多糖類の分子量については、NPSが $1.2 \times 10^6$  Da、APSが $1.1 \times 10^6$  Daと推定された。また、ビリジリアミノ化による糖組成分析の結果、NPS及びAPSともにガラクトース (Gal) とグルコース (Glc) の比は、1.3:1.0であり、ラムノースは含まれていなかった。過塩素酸加水分解後、モリブデン酸アンモニウムを用いるリンの定量法によるリンの含有量は、APSがリンを0.1%含有していたのに対し、NPSにはリンは含まれていなかった。これらの分析結果を表1に示す。

## 【0014】

ものと認められるが、特に、多糖類生産性を有する点、その多糖類にはリンが含まれている点、そのうえ自己免疫疾患予防作用という新規にして有用な生理活性を有する点において特徴的であり、このような菌株は過去に報告された例がないことに鑑み、本菌株を新規菌株と認め、これを*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073 R-1と命名して、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17227として寄託した。

【0018】該乳酸菌は、後記する実施例からも明らかに、CIAの発症を低減させ、なおかつ発症した場合においてもその重篤度は軽減化されることが確認され、この有用新知見に基づき本発明は完成されたものであって、本発明は、自己免疫疾患予防作用を有し、Gal、Glc、リン含有多糖類生産性を有する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなることを特徴とする自己免疫疾患予防組成物に関する

るものである。

【0019】乳酸菌含有物としては、乳酸菌懸濁液；乳酸菌培養物（菌体、培養上清液、培地成分を含む）；乳酸菌培養物から固形分を除去した乳酸菌培養液；乳酸菌飲料、酸乳、ヨーグルト等乳酸菌発酵した飲食品からなる乳酸菌発酵乳；等が挙げられる。

【0020】処理物としては、乳酸菌、乳酸菌含有物、発酵乳の濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等）、希釈物等が挙げられる。また、乳酸菌としては、生菌体、湿潤菌、乾燥菌、死菌体、菌体破砕物等が適宜使用可能である。

【0021】本発明に係る組成物は、乳酸菌、含有物、処理物の少なくともひとつを有効成分として含有してなるものであって、飲食品タイプ及び医薬品タイプのいずれのタイプの組成物としても自由に使用できるものである。

【0022】有効成分の配合量は、任意でよいが、使用目的（予防、保健、又は治療）、患者の年齢、投与方法、剤形等に応じて適宜定めればよく、通常、0.001～10%の範囲が適当である。しかしながら、長期間に亘って保健上ないし健康維持の目的で摂取する場合には、上記範囲よりも少量であってもよいし、また本有効成分は、安全性について問題がないので、上記範囲よりも多量に使用しても一向にさしつかえない。現にマウスを用いた10日間の急性毒性試験の結果、1000mg/kgの経口投与でも死亡例は認められなかった。

【0023】飲食品タイプの組成物として使用する場合には、本有効成分をそのまま、使用したり、他の食品ないし食品成分と併用したりして適宜常法にしたがって使用できる。本有効成分を用いる本発明に係る組成物は、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状のいずれでもよいが、甘味料、酸味料、ビタミン剤その他ドリンク剤製造に常用される各種成分を用いて、健康ドリンクに製剤化すると好適である。

【0024】医薬品タイプの組成物として使用する場合は、本有効成分は、種々の形態で投与される。その投与形態としては例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが、通常は、成人に対して、1日当り、静脈投与の場合は、体重1kg当り、菌体 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$  cfuを投与することができ、筋肉投与の場合は $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  cfuを投与することができる。また、経口投与の場合には $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^{12}$  cfu程度投与すればよいが、本菌は本来食用と

して用いられるものであるので安全性に問題はなく、上記範囲よりも高濃度の投与も可能である。

【0025】該乳酸菌はCIAの発症率を低減させ、なおかつ発症した場合においてもその重篤度は軽減化される。次に、該菌株の発酵乳への利用につき、実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。例えばLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株を用いた発酵乳を製造する際は、該菌株を単独スターターとして利用する方法、該菌株ならびに該菌株と共生作用を有するStreptococcus thermophilus株との混合スターターとして利用する方法、もしくは、その他の乳酸菌（Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus）やBifidobacteriumとの混合スターターとして利用する方法が実施可能である。

【0026】本発明に係る組成物は、上記のように医薬品タイプ、飲食品タイプの組成物とすることができ、特に後者においては、発酵乳、酸乳、乳酸菌飲料、ヨーグルト等の形態に調製することができ、これ（ら）を日常的に摂取することにより、知らず知らずの内に無理なく慢性関節リウマチその他各種の自己免疫疾患を予防、軽減、治療することができる。しかも、本組成物は安全性にも問題がないので、有害な副作用を伴うことなく長期間摂取することができ、自己免疫疾患の予防に極めて好適であり、すぐれた特定保健用食品ということができ。以下、本発明の実施例について述べる。

【0027】

【実施例1】Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株を10%（w/w）脱脂粉乳培地で約18時間培養後、得られた培養液を凍結乾燥処理した。本処理により得られた凍結乾燥粉末をマウス通常飼料に10%（w/w）の割合で配合した。この配合飼料には約 $5 \times 10^6$  cfu/gのLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1が含まれている。次に、Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株またはL.Bulgaricus ATCC 33409株の添加飼料、対照として培地成分（脱脂粉乳）の添加飼料または通常飼料をそれぞれマウス〔DBA/1JNCrj、雌、4週齢（日本チャールズリバー）〕に2週間経口投与した。すなわち、L.Bulgaricus ATCC 33409株投与群、Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株投与群、脱脂粉乳投与群、通常飼料投与群の4群に群分けし（n=10）、投与期間中は各種飼料を自由摂取の形で実施した。摂取量は1日あたり約2g/head、菌数はL.Bulgaricus ATCC33409株、Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株の両者とも約 $1 \times 10^7$  cfu/headであった。これらの飼料を投与後に各マウスをウシII型コラーゲン（bovine type II collagen; bCII）で免疫した。さらに、一次免疫後21日にbCIIで追加免疫を施した。以後、一次免疫後90日までCIAの発症を経時的に観察した。

【0028】CIA発症の評価を次により行った。すなわち、CIAの発症誘導後、各足について経時的にCIAの重篤度を評価した。評価を四段階で行い、その基準は以下の通りである。評価0：全く腫れていない状態。評価1：指が1本腫れている状態。評価2：指が2本腫れている、または甲が腫れている状態。評価3：足全体が非常に腫れている、または骨が変形している状態。

【0029】試験結果を以下に示す。マウス1匹あたりの関節炎指数の平均（図2）、CIAの発症したマウス手足の割合（図3）、およびCIAの発症したマウスの割合（図4）で評価した。すなわち、図2は1匹あたりの関節炎指数の平均値、つまり、関節炎の重篤度がLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株により軽減化されていることを示す。図3はマウスの足で評価した場合、関節炎の発症がLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株により抑制されていることを示す。図4はマウスで評価した場合、関節炎の発症率がLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株により抑制されていることを示す。

【0030】上記結果から明らかなように、いずれの評価においてもLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株投与群は通常飼料投与群と比較して発症率と炎症重篤度の両者とも約1/5に減少し、明らかにCIA発症の抑制が認められた。以上の結果から、該乳酸菌Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1株の発酵物はCIAに対して著しい抑制および重篤度の軽減効果を有し、慢性関節リウマチだけではなく、潰瘍性大腸炎などの各種炎症疾患に対して有用な予防薬、あるいは治療薬となり得ることが認められた。

【0031】

【実施例2】脱脂乳を80～85℃で20～30分間殺菌した後、ホモゲナイズし、冷却した。これにスターターとして本菌株（FERM P-17227）の純培養物を2～5%加え、35～85℃で1～3日間発酵させ、乳酸含量2%の酸乳を得た。

【0032】このようにして得た酸度2%の酸乳について、生じたカードを砕き、原料乳の0.8倍量の蔗糖を加えて攪拌した後、加温しながら蔗糖を同じく0.8倍量更に加えて攪拌し、混合物が半透明のシロップ状になった時点で温度を70～80℃に昇温し、熱時濾過した後冷却し、香料を適量加えて、酸乳飲料（酸度1.2～1.3%）を得た。

【0033】

【実施例3】ビタミンC 40gまたはビタミンCとクエ

ン酸の等量混合物40g、グラニュー糖100g、コーンスターチと乳糖の等量混合物60gに、本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物を40g加えて十分に混合した。混合物を袋に詰め、1袋1.5gのステック状栄養健康食品を150袋製造した。

【0034】

【実施例4】次の配合により慢性関節リウマチ抑制剤を製造した。（1）本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物5g、（2）ラクトース90g、（3）コーンスターチ29g、（4）ステアリン酸マグネシウム1g。まず、（1）、（2）、（3）（但し17g）を混合し、（3）（但し7g）から調製したペーストとともに顆粒化した。得られた顆粒に（3）（但し5g）と（4）を加えてよく混合し、この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1錠あたり有効成分を40mg含有する錠剤100個を製造した。

【0035】

【実施例5】次の配合を用意した。（1）本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥物0.5g、（2）殺菌乳1L。（1）を（2）に無菌的に混合し、ビン詰めした。本発明においては、殺菌乳1Lあたり、（1）を0.01～10gを混合すればよい。

【0036】

【発明の効果】本発明によれば、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎等の自己免疫疾患の予防、軽減、治療が副作用を伴うことなく効率的に実施できる。本発明に係る組成物は、安全性には全く問題はなく、乳製品その他各種飲食品の形態に自由に調製することができるので、健康者のもとより、乳幼児、老令者、病弱者、病後の人等も長期間に亘って摂取することができ、特にすぐれた予防効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】A p a l処理した本菌株のバルスフィールド電気泳動パターンを示す。

【図2】マウス1匹あたりの関節炎指数の平均を示す。

【図3】マウス手足CIA発症率を示す。

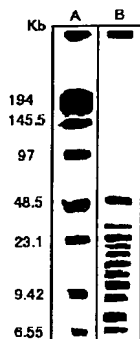
【図4】CIA発症マウスの割合を示す。

【要約】

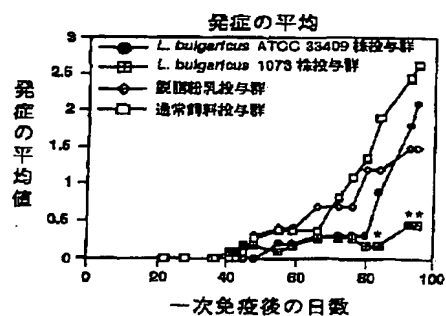
【解決手段】慢性関節リウマチ等自己免疫疾患の予防効果を有するリン含有多糖類生産能を有する乳酸菌（例えば、Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus OLL 1073 R-1）を有効成分とする自己免疫疾患予防/治療用組成物。

【効果】該乳酸菌自体又はそれを用いて調製した酸乳等発酵乳タイプの本組成物は、特に自己免疫疾患予防用組成物として長期間摂取するのに適している。

【図1】

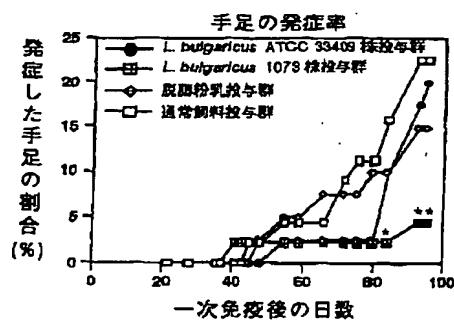


【図2】



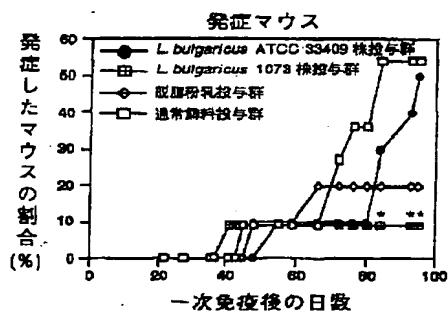
(★: 通常飼料投与群に対して有意;  $p < 0.05$ , t-test)

【図3】



(★: 通常飼料投与群に対して有意;  $p < 0.05$ ,  $\chi^2$ -test)

【図4】



(★: 通常飼料投与群に対して有意;  $p < 0.05$ ,  $\chi^2$ -test)

フロントページの続き

(72)発明者 金子 勉  
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳  
業株式会社中央研究所内  
(72)発明者 野田 勝彦  
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳  
業株式会社中央研究所内

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

A61K 35/74  
A23L 1/30  
C12N 1/20